

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

REC'D 10 FEB 2004

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 00 157.3

Anmeldetag: 07. Januar 2003

Anmelder/Inhaber: LEICA Microsystems Heidelberg
GmbH, Mannheim/DE

Bezeichnung: Konfokales 4-Pi-Mikroskop und Verfahren zur
konfokalen 4-Pi-Mikroskopie

IPC: G 02 B 21/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 02. Oktober 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
 Der Präsident
 Im Auftrag

PRIORITY DOCUMENT
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
 COMPLIANCE WITH
 RULE 17.1(a) OR (b)

Eherf

BEST AVAILABLE COPY

Konfokales 4-Pi-Mikroskop und Verfahren zur konfokalen 4-Pi-Mikroskopie

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zur konfokalen 4-Pi-Mikroskopie.

Die Erfindung betrifft außerdem ein konfokales 4-Pi-Mikroskop mit einer Lichtquelle, die Beleuchtungslicht, das zumindest eine
10 Beleuchtungswellenlänge aufweist, erzeugt, und das von zwei Seiten durch je ein Objektiv auf eine Probe richtbar ist, wobei durch Interferenz des Beleuchtungslichts in der Probe eine stehende Beleuchtungswelle mit einem Beleuchtungs-Hauptmaximum und mit Beleuchtungs-Nebenmaxima erzeugt wird und mit einem Detektor zum Detektieren von von der Probe
15 ausgehendem durch die beiden Objektive hindurch gehendem Detektionslicht, das zumindest eine Detektionswellenlänge aufweist.

In der Scanmikroskopie wird eine Probe mit einem Lichtstrahl beleuchtet, um das von der Probe emittierte Reflexions- oder Fluoreszenzlicht zu beobachten. Der Fokus eines Beleuchtungslichtstrahles wird mit Hilfe einer steuerbaren
20 Strahlablenkeinrichtung, im Allgemeinen durch Verkippen zweier Spiegel, in einer Objektebene bewegt, wobei die Ablenkachsen meist senkrecht aufeinander stehen, so dass ein Spiegel in x-, der andere in y-Richtung ablenkt. Die Verkipfung der Spiegel wird beispielsweise mit Hilfe von Galvanometer-Stellelementen bewerkstelligt. Die Leistung des vom Objekt
25 kommenden Lichtes wird in Abhängigkeit von der Position des Abtaststrahles

gemessen. Üblicherweise werden die Stellelemente mit Sensoren zur Ermittlung der aktuellen Spiegelstellung ausgerüstet.

Speziell in der konfokalen Scanmikroskopie wird ein Objekt mit dem Fokus eines Lichtstrahles in drei Dimensionen abgetastet. Ein konfokales Rastermikroskop umfasst im Allgemeinen eine Lichtquelle, eine Fokussieroptik, mit der das Licht der Quelle auf eine Lochblende – die sog. Anregungsblende – fokussiert wird, einen Strahlteiler, eine Strahlableitvorrichtung zur Strahlsteuerung, eine Mikroskopoptik, eine Detektionsblende und die Detektoren zum Nachweis des Detektions- bzw. Fluoreszenzlichtes. Das Beleuchtungslicht wird über einen Strahlteiler eingekoppelt. Das vom Objekt kommende Detektionslicht, wie Fluoreszenz- oder Reflexionslicht oder auch CARS-Licht, gelangt über die Strahlableitvorrichtung zurück zum Strahlteiler, passiert diesen, um anschließend auf die Detektionsblende fokussiert zu werden, hinter der sich die Detektoren befinden. Detektionslicht, das nicht direkt aus der Fokusregion stammt, nimmt einen anderen Lichtweg und passiert die Detektionsblende nicht, so dass man eine Punktinformation erhält, die durch sequentielles Abtasten des Objekts zu einem dreidimensionalen Bild führt. Meist wird ein dreidimensionales Bild durch schichtweise Bilddatenaufnahme erzielt, wobei die Bahn des Abtastlichtstrahles auf bzw. in dem Objekt idealer Weise einen Mäander beschreibt. (Abtasten einer Zeile in x-Richtung bei konstanter y-Position, anschließend x-Abtastung anhalten und per y-Verstellung auf die nächste abzutastende Zeile schwenken und dann, bei konstanter y-Position, diese Zeile in negative x-Richtung abtasten usw.). Um eine schichtweise Bilddatenaufnahme zu ermöglichen, wird der Probentisch oder das Objektiv nach dem Abtasten einer Schicht verschoben und so die nächste abzutastende Schicht in die Fokusebene des Objektivs gebracht.

Eine Auflösungssteigerung in Richtung der optischen Achse lässt sich, wie in der Europäischen Patentschrift EP 0 491 289 mit dem Titel: „Doppelkonfokales Rastermikroskop“ beschrieben ist, durch eine Doppelobjektivanordnung erreichen. Das vom Beleuchtungssystem

kommende Licht wird in zwei Teilstrahlen aufgespalten, die die Probe einander entgegenlaufend durch zwei spiegelsymmetrisch angeordnete Objektive gleichzeitig beleuchten. Die beiden Objektive sind auf verschiedenen Seiten der ihnen gemeinsamen Objektebene angeordnet. Im
5 Objektpunkt bildet sich durch diese interferometrische Beleuchtung ein Interferenzmuster aus, dass bei konstruktiver Interferenz ein Hauptmaximum und mehrere Nebenmaxima aufweist. Die Nebenmaxima sind hierbei im Allgemeinen entlang der optischen Achse angeordnet. Mit einem doppelkonfokalen Rastermikroskop kann im Vergleich zum konventionellen
10 Rastermikroskop durch die interferometrische Beleuchtung eine erhöhte axiale Auflösung erzielt werden.

Die Nebenmaxima erzeugen bei der Bildaufnahme störende Doppelbilder, die über mathematische Bildrekonstruktionsverfahren beseitigt werden müssen. Diese Verfahren funktionieren umso besser, umso niedriger die Nebenmaxima
15 sind. In der Praxis hat sich gezeigt, dass nur dann eine artefaktfreie Rekonstruktion vorgenommen werden kann, wenn die Amplitude der Nebenmaxima maximal 50% der Amplitude des Hauptmaximums beträgt. Die in der Konfokalmikroskopie bevorzugte 1-Photonenanregung erzeugt aber in einem Standard-4-Pi-Mikroskop Nebenmaxima von ca. 65% Höhe und ist
20 daher nicht für strukturauflösende Aufnahmen nutzbar.

Aus der Deutschen Offenlegungsschrift DE 100 10 154 A1 ist ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Beleuchtung eines transparenten Objekts, insbesondere zur Anwendung in der doppelkonfokalen Rastermikroskopie bekannt, wobei zur Beleuchtung eines Punkts des Objekts zwei aus
25 entgegengesetzten Richtungen (auf den Punkt fokussierte Lichtwellen einer kohärenten Lichtquelle zu einem Beleuchtungsmuster interferieren, und ist zur ursächlich Vermeidung der Probleme der Rekonstruktionsverfahren dadurch gekennzeichnet, dass mindestens zwei zusätzliche, aufeinander zu laufende, kohärente Lichtwellen überlagert werden, um die Nebenmaxima des
30 Beleuchtungsmusters zu minimieren.

Aus der Deutschen Offenlegungsschrift DE 101 07 095 A1 ist ein

doppelkonfokales Rastermikroskop mit einem Beleuchtungsstrahlengang einer Lichtquelle und einem Detektionsstrahlengang eines Detektors bekannt. Das doppelkonfokale Rastermikroskop ist zur ursächlichen Vermeidung der Probleme der Rekonstruktionsmethoden dadurch gekennzeichnet, dass
5 mindestens ein auf den Beleuchtungs- und/oder Detektionsstrahlengang wirkendes optisches Bauteil vorgesehen und derart ausgestaltet ist, dass es die Amplitude und/oder die Phase und/oder die Polarisation des Lichts beeinflusst und hierdurch die Charakteristik der doppelkonfokalen Beleuchtung und/oder Detektion veränderbar ist.

- 10 Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur konfokalen 4-Pi-Mikroskopie vorzuschlagen, das einfach und effizient die durch Nebenmaxima hervorgerufene Bildartefakte vermeidet.

Die Aufgabe wird durch ein Verfahren gelöst, dass durch folgende Schritte gekennzeichnet ist:

- 15 • Kohärentes Beleuchten einer Probe von zwei Seiten durch je ein Objektiv mit Beleuchtungslicht, das zumindest eine Beleuchtungswellenlänge aufweist, wobei durch Interferenz des Beleuchtungslichts in der Probe eine stehende Beleuchtungswelle mit einem Beleuchtungs-Hauptmaximum und mit Beleuchtungs-
20 Nebenmaxima erzeugt wird und
- Detektieren des von der Probe ausgehenden Detektionslichtes, das zumindest eine Detektionswellenlänge aufweist, durch die beiden Objektive hindurch, wobei das Detektionslicht zur Interferenz gebracht wird und dadurch in der Probe ein Detektionsmuster mit einem
25 Detektions-Hauptmaximum und mit Detektions-Nebenmaxima derart erzeugt wird, dass die Beleuchtungs-Nebenmaxima und die Detektions-Nebenmaxima sich an unterschiedlichen Orten befinden.

- Es ist außerdem eine Aufgabe der Erfindung ein konfokales 4-Pi-Mikroskop anzugeben, bei dem effizient die durch Nebenmaxima hervorgerufenen
30 Bildartefakte vermieden sind.

Diese Aufgabe wird durch ein konfokales 4-Pi-Mikroskop gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, dass das Detektionslicht interferiert und in der Probe ein Detektionsmuster mit einem Detektions-Hauptmaximum und mit Detektions-Nebenmaxima erzeugbar ist, wobei sich die Beleuchtungs-Nebenmaxima und die Detektions-Nebenmaxima sich an unterschiedlichen Orten befinden.

Die Erfindung hat den Vorteil, dass eine verbesserte Bildqualität in der konfokalen 4-Pi-Mikroskopie erzielbar ist. Dadurch dass das Detektionslicht interferiert und in der Probe ein Detektionsmuster mit einem Detektions-Hauptmaximum, mit Detektions-Nebenmaxima und mit Detektions-Minima erzeugt, wobei die Beleuchtungs-Nebenmaxima und die Detektions-Minima zumindest teilweise überlappen – sonst lägen die Beleuchtungs-Nebenmaxima und die Detektions-Nebenmaxima nicht an unterschiedlichen Orten –, werden die durch die Beleuchtungsnebenmaxima angeregten Bereiche der Probe nicht oder zumindest mit reduzierter Empfindlichkeit detektiert.

In der 4-Pi-Mikroskopie wird durch die kohärente Beleuchtung zweier einander gegenüberstehender Objektive eine stehende Welle im gemeinsamen Fokus der Objektive erzeugt. Diese stehende Welle moduliert die Punktbildfunktion (PSF) des gewöhnlichen konfokalen Mikroskops axial und erzeugt dadurch mehrere Maxima mit einer 4- bis 7-fach verringerten Halbwertsbreite. Dadurch ist die axiale Auflösung um diesen Faktor entsprechend erhöht verglichen mit einem gewöhnlichen konfokalen Laserrastermikroskop bei Verwendung eines Objektivs höchster numerischer Apertur. Wenn nun sowohl das Anregungslicht als auch das detektierte Licht über beide Objektive jeweils miteinander interferiert, erhält man neue Möglichkeiten, in die PSF-Gestaltung einzugreifen. Erfindungsgemäß wurde erkannt, dass der Abstand der Nebenmaxima zum Hauptmaximum zur jeweiligen Wellenlänge proportional ist. Beispielsweise durch die Verwendung von möglichst unterschiedlichen Wellenlängen in Detektion und Beleuchtung kann erfindungsgemäß erreicht werden, dass die Nebenmaxima der Beleuchtungs- und die der Detektions-PSF nur geringfügig überlappen. Die effektive PSF, die sich aus dem Produkt der beiden PSFs ergibt, besitzt dadurch gesenkte Nebenmaxima. Liegt die

Detektionswellenlänge z.B. ca. 50% über der der Beleuchtungswellenlänge, fällt das Nebenmaximum der Detektion in das zweite Minimum der Beleuchtungs-PSF und wird dadurch massiv unterdrückt. Die Nebenmaxima lassen sich dadurch in der praktischen Anwendung auf ca. 30% der Hauptmaximumshöhe senken.

Die Optische-Transfer-Funktion (OTF) des 4Pi-konfokalen Mikroskops bei 1-Photonen-Anregung besitzt ausgeprägtere Minima bei der kritischen Raumfrequenz k_c , die zwischen dem Hauptmaximum und den ersten Nebenmaxima liegt, als die OTFs der 4-Pi-konfokalen 2-Photonen-Techniken.

Bei der meist erforderlichen Bildrestaurierung muss insbesondere das Signal bei diesen Raumfrequenzen verstärkt werden. Bei schlechtem Signal-zu-Rausch-Verhältnis sind daher diese Bereiche des Raumfrequenzspektrums bei der Rekonstruktion besonders anfällig, störende Artefakte zu erzeugen, die die Bildinterpretation schwierig bis unmöglich machen.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird durch Einfügen von Pupillenfiltern in zumindest eine Pupillenebene der Objektive oder in zumindest eine optisch zu der Pupillenebene korrespondierenden Ebene die räumliche Lage der Beleuchtungs-Nebenmaxima und/oder der Detektions-Nebenmaxima festgelegt und/oder verändert. Durch den Einsatz von Pupillenfiltern kann die 4-Pi-PSF verändert werden. Insbesondere können auf diese Weise Nebenmaxima etwas verschoben werden. Pupillenfilter sind insbesondere bei 2-Photonenanregung von Vorteil. Auch bei der 1-Photonenanregung führen insbesondere in Kombination mit der Maßnahme des Auswählens eines Verhältnisses von Beleuchtungswellenlänge zu Detektionswellenlänge im Bereich von 0,5 bis 0,9, insbesondere im Bereich von 0,7 bis 0,8, insbesondere bei 0,75 zu besonders guter Unterdrückung der Störeffekte durch die Beleuchtungs-Nebenmaxima.

Die OTF eines Mikroskops kann durch eine Veränderung der Pupillenfunktion optimiert werden. Durch Betonung der Bereiche mit extremen k_z -Werten, das sind der äußerste Ring sowie die Mitte der Pupille, wird tendenziell die OTF geglättet. Die Frage ist, welches die optimalen Werte der Pupillenfunktion

sind, und ob andere, evtl. nicht so offensichtliche Funktionen nicht noch bessere Ergebnisse liefern.

Das Prinzip strukturierter Pupillenfunktionen zur Auflösungserhöhung wurde schon Anfang der 50-er Jahre von G. Toraldo di Francia in der Hellfeld-
5 Mikroskopie verfolgt. Den Filter-Optimierungsprozess kann man sich im Ortsraum so vorstellen, dass man die Apertur des Objektivs in konzentrische Ringe aufteilt. Jeder der Ringe erzeugt entsprechend seines Radius unterschiedliche laterale Raumfrequenzen in der Fokusebene. Durch geeignete Kombination zweier Ringe kann daher für einen Punkt im Abstand ρ
10 vom Zentrum der PSF erreicht werden, dass er einerseits Teil des n -ten Beugungsmaximums des einen Ringes ist, andererseits aber zum $n+(2m+1)$ -ten Beugungsmaximum des anderen Ringes gehört. Die Amplituden der beiden Beugungsmaxima sind in diesem Fall einander entgegengerichtet und durch geeignete Ringbreiten- oder Amplitudenwahl kann es daher zu einer
15 völligen Auslöschung des aus diesem Punkt emittierten elektromagnetischen Feldes kommen.

Auf diese Weise können sukzessive benachbarte Radian minimiert werden. Mit diesen sogenannten Toraldo-Filtern können theoretisch sehr scharfe Feldverteilungen um den Ursprung geschaffen werden, deren ringförmiges
20 Umfeld in einem frei wählbaren Bereich beliebig stark gegen Null gesenkt werden kann. Allerdings nimmt das Signal aus dem Zentrum dabei ebenfalls drastisch ab. Bereiche außerhalb des optimierten Bereichs werden dagegen teilweise stark in den Innenbereich hineingebeugt und können bei entsprechender Helligkeitsverteilung der Probe das Signal im Zentrum leicht
25 übertreffen. Dadurch wird schnell eine experimentell verwirklichtbare Grenze erreicht.

Prinzipiell kann nicht nur die Amplitude sondern auch die Phase des elektromagnetischen Feldes durch die Pupillenfunktion verändert werden. In einer praktischen Realisierung benutzt man hierzu phasenverzögernde
30 Elemente wie z.B. Phasenplatten, insbesondere $\lambda/2$ -Platten. Zusätzlich lässt sich das Prinzip auch ohne weiteres auf Kosten der beiden lateralen Dimensionen auf die dritte Dimension ausweiten. 11.

In der konfokalen Mikroskopie bietet sich eine Anwendung insofern an, da z.B. die hellen Außenbereiche der Anregungs-PSF mit Toraldo-Filtern durch die konfokale Detektions-PSF unterdrückt werden können. Die dort erreichbaren Effekte bewegen sich allerdings nur im Prozentbereich, so dass in den meisten Fällen die Nachteile des Toraldo-Konzepts überwiegen.

In der 4-Pi-konfokalen Mikroskopie soll mit Hilfe der Toraldo-Filter nicht primär die Auflösung gesteigert werden. Ziel ist stattdessen, die auftretenden Nebenmaxima in der PSF zu reduzieren, um auf diesem Weg die schwachen Bereiche der OTF um die kritische Frequenz k_c zu heben. Die Vorgehensweise ist dabei analog. Es kann jedoch auf einem relativ eingeschränkten axialen Bereich agiert werden, wodurch die negativen Nebeneffekte nicht so drastisch ausfallen.

Vorzugsweise ist die Probe mit zumindest einem Lumineszenzfarbstoff, insbesondere mit einem Fluoreszenzfarbstoff, markiert. In einer bevorzugten Ausgestaltung ist der Fluoreszenzfarbstoff derart ausgewählt, dass ein Verhältnis von Beleuchtungswellenlänge zu Detektionswellenlänge im Bereich von 0,5 bis 0,9, insbesondere im Bereich von 0,6 bis 0,8, insbesondere bei 0,75, einstellbar ist. Hierzu ist Bezug auf das konfokale 4-Pi-Mikroskop zumindest eine Detektionswellenlänge auswählbar und der Detektor auf die ausgewählte Detektionswellenlänge einstellbar. In einer Variante ist der Detektor als Multibanddetektor ausgeführt, da dieser in Bezug auf das erfindungsgemäße Verfahren und das erfindungsgemäße Mikroskop besonders flexibel und vorteilhaft einsetzbar ist. Ebenso ist vorgesehen, dass die zumindest eine vorzugsweise freie Beleuchtungswellenlänge auswählbar und die Lichtquelle auf die ausgewählte Beleuchtungswellenlänge einstellbar ist.

Vorzugsweise weist der Fluoreszenzfarbstoff einen Anregungs- und einen Emissionsbereich auf, wobei die Beleuchtungswellenlänge im kurzwelligen Anteil des Anregungsbereichs und/oder die Detektionswellenlänge im langwelligen Anteil des Emissionsbereichs liegt.

Der in der Praxis zugängliche Stokes-Shift-Bereich ist bei einigen Farbstoffen

sehr eingeschränkt. Einige grün emittierende Farbstoffe weisen einen Unterschied zwischen Anregungs- und Emissionsmaximum von ca. 20 - 30 nm auf. Die spektrale Bandbreite beträgt bei der Anregung und im Fluoreszenzspektrum jeweils ca. 50 nm. Verzichtet man auf den Großteil des kurzwelligen Fluoreszenzlichts und nutzt den Farbstoff zusätzlich im schwer anregbaren blauverschobenen Anregungsspektrum, so kann man auf diesem Weg einen Stokes-Shift von ca. 120 nm erreichen. Rote Farbstoffe weisen typischerweise einen größeren Stokes-Shift auf. Es ist auch möglich, einen möglichst großen Anti-Stokes-Shift zu verwenden, wobei dies leider manchmal am kleinen Überlappungsbereich der Anregungs- und Emissionsspektren scheitert. Einige Farbstoffe sind verfügbar, die auch bei Anregung im blau-grünen Bereich einen akzeptablen Stokes-Shift, bzw. ein sehr breitbandiges Emissionsspektrum aufweisen.

Die Effizienzeinbuße bei der Nutzung eines kleinen Ausschnitts des Fluoreszenzspektrums ist meist tolerierbar, insbesondere wenn man sie mit der erfindungsgemäß ebenfalls möglichen Zweiphotonenanregung vergleicht, die eine aufgrund von Photobleichen geringere Ausbeute hat als die konfokale Mikroskopie mit 1-Photonen-Anregung. Für die Mehrphotonenanregung ist die Lichtquelle vorzugsweise als Puls laser ausgeführt.

In einer bevorzugten Ausgestaltung weist das Beleuchtungslicht eine weitere Beleuchtungswellenlänge auf, wobei die Anregung über ein virtuelles oder über ein reales Zwischenniveau erfolgt.

In einer bevorzugten Variante erfolgt die Anregung über ein höheres Anregungsniveau, insbesondere über einen S_0 - S_2 -Übergang. Dies ist eine Alternative, die nicht auf einer Einschränkung des Fluoreszenzspektrums beruht. Meist erfolgt ein strahlungsloser Relaxations-Übergang vom S_2 - in den S_1 -Zustand vor der Fluoreszenz. Dadurch wird ein sehr großer Stokes-Shift erzeugt. Die Anwendbarkeit dieser Methode ist davon abhängig, inwieweit das Bleichen durch diese relativ hochenergetische Anregung verstärkt wird.

Der Anti-Stokes-Bereich eines Farbstoffs kann möglicherweise durch eine künstliche Anhebung der Moleküle aus dem Vibrationsgrundzustand des

elektronischen Grundzustands S_0 in einen höheren Vibrationszustand leichter ausgenutzt werden. Werden die Farbstoffe aus diesem angeregten Zustand in den S_1 -Zustand gebracht und detektiert man erfindungsgemäß nur das kurzwellige Fluoreszenzlicht aus dem Zerfall in einen möglichst niedrigen Zustand, so ist die Wellenlänge des Fluoreszenzlichts deutlich kürzer als die
5 des Anregungslichts. Durch IR-Strahlung ist eine Anregung dieser Vibrationszustände möglich.

In einer anderen Variante beinhaltet die Anregung der Probe einen Förster-
resonanten Energietransfer (FRET) innerhalb der Probe. Hierzu werden
10 gekoppelte Farbstoffe verwendet, bei denen ein hochenergetisch anregbarer Farbstoff (der Donor) über resonanten Energietransfer die Anregungsenergie auf einen niederenergetischeren Farbstoff (den Akzeptor) abgibt, der dann im stark rot-verschobenen Bereich fluoresziert. Auch die Nutzung einer Farbstoffkette unter Ausnutzung mehrfacher Kopplung ist möglich. Förster-
15 Energietransfer (FRET) zwischen zwei Farbstoffmolekülen wird zur Abstandsbestimmung zwischen diesen Molekülen in mittlerweile weitverbreiteten FRET-Experimenten genutzt. Transfereffizienzen von fast 100% werden in der Praxis erreicht. Im Unterschied zu diesen Experimenten ist im 4-Pi-Fall eine permanente Kopplung nötig. Über einen Antikörper, der
20 spezifisch diese beiden Farbstoffmoleküle bindet, ist dies aber prinzipiell möglich.

Das konfokale 4-Pi-Mikroskop weist vorzugsweise eine Detektionslochblende mit einem kleineren Öffnungsdurchmesser als 1 Airyscheibe, insbesondere einen Öffnungsdurchmesser von 0,7 bis 0,8 Airyscheiben, auf. Durch eine
25 besondere Beachtung der Größe der Detektionslochblende können die Nebenmaxima erfindungsgemäß reduziert werden und wiederum die Anforderungen an den Stokes-Shift des Fluoreszenzfarbstoffs verringert werden. Im Gegensatz zum klassischen konfokalen Mikroskop, bei dem der Öffnungsdurchmesser der Detektionslochblende kaum Einfluss auf die
30 Auflösung hat, hängt die Nebenmaximahöhe im konfokalen 4π -Mikroskop relativ stark von dieser Größe ab.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist auch in der I⁵M- und Wellenfeld-

Mikroskopie anwendbar.

In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben, wobei gleich wirkende Elemente mit denselben Bezugszeichen versehen sind. Dabei zeigen:

- 5 Fig. 1 ein erfindungsgemäßes konfokales 4-Pi-Mikroskop,
Fig. 2 z-Profil des 4-Pi-konfokalen Mikroskops bei Einphotonenanregung und mit einem Pupillenfilter,
Fig. 3 theoretische OTFs und PSFs des 4Pi-konfokalen Mikroskops,
Fig. 4 Fig. 4 zeigt Spektren des typischen Fluoreszenzfarbstoffs Fluorescein
10 und des Farbstoffs FM4-64,
Fig. 5 schematisch die erfindungsgemäße Überlappung der Detektions-Minima und der Beleuchtungs-Nebenmaxima und
Fig. 6 die Abhängigkeit der relativen Höhe der Nebenmaxima vom Stokes-Shift.
- 15 Fig. 1 zeigt ein konfokales 4-Pi-Mikroskop 1 mit einer Lichtquelle 3, die Beleuchtungslicht 5 emittiert. Das Beleuchtungslicht 5 wird mit der Linse 7 auf das Beleuchtungslochblende 9 fokussiert, passiert diese und durchläuft anschließend die erste Optik 11, die zweite Optik 13 und einen Pupillenfilter 15, der zwischen der ersten Optik 11 und der zweiten Optik 13 angeordnet ist.
- 20 Von einem Strahlteiler 17, der als dichroitischen Strahlteiler ausgeführt ist, wird das Beleuchtungslicht 5 durch die Optik 19 hindurch zu einer Strahlablenkeinrichtung 21 reflektiert, die einen kardanisch gelagerten Scanspiegel 23 beinhaltet. Der Scanspiegel 23 der Strahlablenkeinrichtung 21 ist um zwei Achsen schwenkbar gelagert, so dass durch geeignetes
- 25 Schwenken des Scanspiegel 23 das Beleuchtungslicht abgelenkt bzw. gescannt werden kann. Von der Strahlablenkeinrichtung gelangt das Beleuchtungslicht 5 durch die Scanoptik 25 und durch die Tubusoptik 27 zu einem weiteren Strahlteiler 29 der das Beleuchtungslicht in einen ersten Beleuchtungslichtteilstrahl 31 und einen zweiten Beleuchtungslichtteilstrahl 33 aufteilt. Der erste Beleuchtungslichtteilstrahl 31 gelangt über den ersten
- 30

Umlenkspiegel 35 zu dem ersten Objektiv 37, das eine erste Pupille 39 aufweist und das den ersten Beleuchtungslichtteilstrahl 31 auf die Probe 41 fokussiert. Der zweite Beleuchtungslichtteilstrahl 33 gelangt über den zweiten Umlenkspiegel 43 zu dem zweiten Objektiv 45, das eine zweite Pupille 47 aufweist und das den zweiten Beleuchtungslichtteilstrahl 31 ebenfalls auf die Probe 41 fokussiert, wobei dieser mit dem ersten Beleuchtungslichtteilstrahl 31 interferiert. Der Pupillenfilter 15 befindet sich in einer optisch zu den Pupillenebenen in denen sich die Pupillen 39, 47 befinden korrespondierenden Ebene. Von der Probe 41 ausgehendes Detektionslicht gelangt in Form eines ersten Detektionslichtteilstrahles 49 durch das erste Objektiv 37 und über und den ersten Umlenkspiegel 35 zu dem weiteren Strahlteiler 29 und interferiert dort mit einem zweiten Detektionslichtteilstrahl 51, der durch das zweite Objektiv 45 und über und den zweiten Umlenkspiegel 43 zu dem weiteren Strahlteiler 29 gelangt. Das interferierende Detektionslicht 53 wird über die Tubusoptik 27, die Scanoptik 25 und über die Strahlableitvorrichtung 21 zu dem Strahlteiler 17 geführt, passiert diesen und gelangt nach Passieren der Detektionsoptik 55 durch die Detektionslochblende 57, die einen Öffnungsdurchmesser von 0,7 Airyscheiben aufweist, zu dem Detektor 59, der einen Photomultiplier beinhaltet. Der Pupillenfilter 15 ist als Zonenfilter mit 3 getrennten Phasenringen ausgeführt. Die Wellenlänge des Beleuchtungslichtes beträgt 488 nm. Die des Detektionslichtes beträgt 688nm. Im Strahlengang des Detektionslicht 53 ist ein weiterer Pupillenfilter 71 vorgesehen.

Fig. 2 zeigt z-Antworten des 4Pi-konfokalen Mikroskops bei Einphotonenanregung und mit einem Pupillenfilter 15. Der Pupillenfilter 15 befindet sich in einer optisch zu den Pupillenebenen in denen sich die Pupillen 39, 47 befinden korrespondierenden Ebene. Aufgetragen sind die z-Antworten für Pupillenfilter mit unterschiedlichen Zonenanzahlen. Bevorzugt wird der links unten gezeigte Filter verwendet, weil dieser auch in den Randbereichen niedrige z-Antworten aufweist. Allerdings spielen die Randbereiche bei sehr dünnen Proben keine Rolle, da diese außerhalb der Probe liegen. Dargestellt sind die Profile für Phasenring-Filter im

Anregungsstrahlengang mit 1, 2 und 3 getrennten Phasenringen sowie der Referenzfall ohne Pupillenfilter. Der grau unterlegte Bereich liegt außerhalb der optimierten Zone. Je nach Optimierung werden stark verschiedene Verläufe der z-Antworten außerhalb des optimalen Bereichs erreicht. (Die z-Antwort täuscht etwas darüber hinweg, da hier einzelne Punkte linear ins Gewicht fallen und nicht quadratisch wie bei der Berechnung von Delta.) Dafür steigen die Außenbereiche relativ zum zentralen Maximum unverhältnismäßig stark an. (Anregungswellenlänge 488 nm, Stokes-Shift 10%, infinitesimal kleine Detektionslochblende, Wasser-Immersionsobjektiv mit halbem Öffnungswinkel von 1,1 rad.)

Fig. 3 zeigt theoretische OTFs und PSFs des 4Pi-konfokalen Mikroskops in Abhängigkeit vom Stokes-Shift. Die z-Antworten und die Profile entlang der kz-Achse der OTF sind gegen die Detektionswellenlänge aufgetragen. Die beiden Fälle einer Detektionslochblende von 0 (punktförmig) und 1 Airy-Scheibe Durchmesser sind jeweils dargestellt. Es wurde von $\alpha=63^\circ$ (1,1 rad), $n = 1,33$ und einer Anregungswellenlänge von 488nm ausgegangen. Auf diese Wellenlänge beziehen sich auch die angegebenen Werte für den relativen Stokes-Shift. Die Konturlinien liegen bei 50% (weiß), 40%, 30%, 20%, 10% (gestrichelt) und 5% (gepunktet; nur OTFs) der Maximalwerte.

Fig. 4 zeigt Spektren des typischen Fluoreszenzfarbstoffs Fluorescein und des Farbstoffs FM4-64 mit einem außergewöhnlich großen Stokes-Shift. Die Emissionsspektren sind schwarz eingezeichnet, die Anregungs- bzw. Absorptionsspektren grau.

Fig. 5 zeigt schematisch die erfindungsgemäße Überlappung der Detektions-Minima 61 und der Beleuchtungs-Nebenmaxima 63. Dargestellt ist auch das Beleuchtungs-Hauptmaximum 65 und das Detektions-Hauptmaximum 67. Die z-Antwort ergibt sich aus dem Produkt des ersten Graphen 69 für die Beleuchtungs-PSF und des zweiten Graphen 73 für die Detektions-PSF.

Fig. 6 zeigt die Abhängigkeit der relativen Höhe der Nebenmaxima vom Stokes-Shift bei Benutzung von Absorptions-Filtern (3 Zonen) für die 4-PI-Typen A und C in 1- und 2-Photonen-Anregung. Die Werte sind relativ zur

Höhe des jeweiligen Hauptmaximums angegeben. ES ist jeweils die Referenzkurve für die 4-PI-Mikroskopie ohne Pupillenfilter, die Kurve bei Verwendung der Filter nur in der Anregung und das Verhalten bei Filtern im Anregungs- und im Detektionsstrahlengang aufgeführt. Typische Stokes-Shifts
5 sind durch die gestrichelten Senkrechten markiert. Für die Berechnung wurde von Objektiven mit einem halben Objektivöffnungswinkel von 1,1 rad und einer infinitesimal kleinen Detektionslochblende ausgegangen.

Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform beschrieben. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und
10 Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den Schutzbereich der nachstehenden Ansprüche zu verlassen.

Bezugszeichenliste:

	1	konfokales 4-Pi-Mikroskop
	3	Lichtquelle
5	5	Beleuchtungslicht
	7	Linse
	9	Beleuchtungslochblende
	11	erste Optik
	13	zweite Optik
10	15	Pupillenfilter
	17	Strahlteiler
	19	Optik
	21	Strahlablenkeinrichtung
	23	Scanspiegel
15	25	Scanoptik
	27	Tubusoptik
	29	weiterer Strahlteiler
	31	erster Beleuchtungslichtteilstrahl
	33	zweiter Beleuchtungslichtteilstrahl
20	35	erster Umlenkspiegel
	37	erstes Objektiv
	39	erste Pupille
	41	Probe
	43	zweiter Umlenkspiegel
25	45	zweites Objektiv

	47	zweite Pupille
	49	erster Detektionslichtteilstrahl
	51	zweiter Detektionslichtteilstrahl
	53	interferierendes Detektionslicht
5	55	Detektionsoptik
	57	Detektionslochblende
	59	Detektor
	61	Detektions-Minima
	63	Beleuchtungs-Nebenmaxima
10	65	Beleuchtungs-Hauptmaximum
	67	Detektions-Hauptmaximum
	69	erster Graph
	71	weiterer Pupillenfilter
	73	zweiter Graph

Patentansprüche

1. Verfahren zur konfokalen 4-Pi-Mikroskopie, gekennzeichnet durch folgende Schritte:

- 5 • Kohärentes Beleuchten einer Probe von zwei Seiten durch je ein
Objektiv mit Beleuchtungslicht, das zumindest eine
Beleuchtungswellenlänge aufweist, wobei durch Interferenz des
Beleuchtungslichts in der Probe eine stehende Beleuchtungswelle mit
einem Beleuchtungs-Hauptmaximum und mit Beleuchtungs-
Nebenmaxima erzeugt wird und
- 10 • Detektieren des von der Probe ausgehenden Detektionslichtes, das
zumindest eine Detektionswellenlänge aufweist, durch die beiden
Objektive hindurch, wobei das Detektionslicht zur Interferenz gebracht
wird und dadurch in der Probe ein Detektionsmuster mit einem
Detektions-Hauptmaximum und mit Detektions-Nebenmaxima derart
- 15 erzeugt wird, dass die Beleuchtungs-Nebenmaxima und die
Detektions-Nebenmaxima sich an unterschiedlichen Orten befinden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die
Objektive je eine Pupille aufweisen und dass durch Einfügen von
Pupillenfiltern in zumindest eine Pupillenebene oder in zumindest eine optisch
- 20 zu der Pupillenebene korrespondierenden Ebene die räumliche Lage der
Beleuchtungs-Nebenmaxima und/oder der Detektions-Nebenmaxima
festgelegt und/oder verändert werden.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch
gekennzeichnet, dass die Probe mit zumindest einem Fluoreszenzfarbstoff
- 25 markiert ist.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die
Anregung der Probe durch Mehrphotonenanregung, insbesondere
Zweiphotonenanregung, bewirkt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Anregung der Probe einen Förster-resonanten Energietransfer (FRET) innerhalb der Probe beinhaltet.
6. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Beleuchtungslicht eine weitere Beleuchtungswellenlänge aufweist und die Anregung über ein virtuelles oder über ein reales Zwischenniveau erfolgt.
7. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Anregung über ein höheres Anregungsniveau, insbesondere über einen S_0 - S_2 -Übergang, erfolgt.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis von Beleuchtungswellenlänge zu Detektionswellenlänge im Bereich von 0,5 bis 0,9, insbesondere im Bereich von 0,6 bis 0,8, insbesondere bei 0,75 liegt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Fluoreszenzfarbstoff einen Anregungs- und einen Emissionsbereich aufweist, wobei die Beleuchtungswellenlänge aus dem kurzwelligen Anteil des Anregungsbereichs und/oder die Detektionswellenlänge aus dem langwelligen Anteil des Emissionsbereichs gewählt wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass eine Detektionslochblende vorgesehen ist, deren Öffnungsdurchmesser kleiner als 1 Airyscheibe, insbesondere von 0,7 bis 0,8 Airyscheiben, insbesondere von 0,7 Airyscheiben, eingestellt wird.
11. Konfokales 4-Pi-Mikroskop mit einer Lichtquelle, die Beleuchtungslicht, das zumindest eine Beleuchtungswellenlänge aufweist, erzeugt, und das von zwei Seiten durch je ein Objektiv auf eine Probe richtbar ist, wobei durch Interferenz des Beleuchtungslichts in der Probe eine stehende Beleuchtungswelle mit einem Beleuchtungs-Hauptmaximum und mit Beleuchtungs-Nebenmaxima erzeugt wird und mit einem Detektor zum Detektieren von von der Probe ausgehendem durch die beiden Objektive hindurch gehendem Detektionslicht, das zumindest eine

Detektionswellenlänge aufweist, dadurch gekennzeichnet, dass das Detektionslicht interferiert und in der Probe ein Detektionsmuster mit einem Detektions-Hauptmaximum und mit Detektions-Nebenmaxima erzeugbar ist, wobei sich die Beleuchtungs-Nebenmaxima und die Detektions-Nebenmaxima
5 sich an unterschiedlichen Orten befinden.

12. Konfokales 4-Pi-Mikroskop nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Objektive je eine Pupille aufweisen und dass Pupillenfiltern in zumindest eine Pupillenebene oder in zumindest eine optisch zu der Pupillenebene korrespondierenden Ebene einfügbar sind, die die
10 räumliche Lage der Beleuchtungs-Nebenmaxima und/oder der Detektions-Nebenmaxima festlegen.

13. Konfokales 4-Pi-Mikroskop nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass der zumindest eine Pupillenfilter eine Phasenplatte, die insbesondere Bereiche unterschiedlicher Phasenverzögerung aufweist,
15 insbesondere eine $\lambda/2$ -Platte beinhaltet.

14. Konfokales 4-Pi-Mikroskop nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die zumindest eine Detektionswellenlänge auswählbar und der Detektor auf die ausgewählte Detektionswellenlänge einstellbar ist.

15. Konfokales 4-Pi-Mikroskop nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die zumindest eine Beleuchtungswellenlänge auswählbar und die Lichtquelle auf die ausgewählte Beleuchtungswellenlänge einstellbar ist.

16. Konfokales 4-Pi-Mikroskop nach einem der Ansprüche 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe mit zumindest einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist.

17. Konfokales 4-Pi-Mikroskop nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtquelle ein Laser, insbesondere ein Puls laser, ist und dass die Anregung der Probe durch Mehrphotonenanregung, insbesondere Zweiphotonenanregung, bewirkbar ist.
30

18. Konfokales 4-Pi-Mikroskop nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Anregung der Probe einen Förster-resonanten Energietransfer (FRET) innerhalb der Probe beinhaltet.
19. Konfokales 4-Pi-Mikroskop nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Beleuchtungslicht eine weitere Beleuchtungswellenlänge aufweist und die Anregung der Probe über ein virtuelles oder über ein reales Zwischenniveau erfolgt.
20. Konfokales 4-Pi-Mikroskop nach einem der Ansprüche 16 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Anregung über ein höheres Anregungsniveau, insbesondere über einen S_0 - S_2 -Übergang, erfolgt.
21. Konfokales 4-Pi-Mikroskop nach einem der Ansprüche 11 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis von Beleuchtungswellenlänge zu Detektionswellenlänge im Bereich von 0,5 bis 0,9, insbesondere im Bereich von 0,6 bis 0,8, insbesondere bei 0,75 liegt.
22. Konfokales 4-Pi-Mikroskop nach einem der Ansprüche 16 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass der Fluoreszenzfarbstoff einen Anregungs- und einen Emissionsbereich aufweist, wobei die Beleuchtungswellenlänge im kurzwelligen Anteil des Anregungsbereichs und/oder die Detektionswellenlänge im langwelligen Anteil des Emissionsbereichs liegt.
23. Konfokales 4-Pi-Mikroskop nach einem der Ansprüche 11 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass das konfokale 4-Pi-Mikroskop eine Detektionslochblende mit einem kleineren Öffnungsdurchmesser als 1 Airyscheibe, insbesondere von 0,7 bis 0,8 Airyscheiben, insbesondere von 0,7 Airyscheiben, aufweist.

25

Zusammenfassung

Ein Verfahren zur konfokalen 4π -Mikroskopie ist gekennzeichnet durch das kohärente Beleuchten einer Probe von zwei Seiten durch je ein Objektiv mit Beleuchtungslicht, das zumindest eine Beleuchtungswellenlänge aufweist, wobei durch Interferenz des Beleuchtungslichts in der Probe eine stehende Beleuchtungswelle mit einem Beleuchtungs-Hauptmaximum und mit Beleuchtungs-Nebenmaxima erzeugt wird und durch das Detektieren des von der Probe ausgehenden Detektionslichtes, das zumindest eine Detektionswellenlänge aufweist, durch die beiden Objektive hindurch, wobei das Detektionslicht zur Interferenz gebracht wird und dadurch in der Probe ein Detektionsmuster mit einem Detektions-Hauptmaximum, mit Detektions-Nebenmaxima und mit Detektions-Minima derart erzeugt wird, dass die Beleuchtungs-Nebenmaxima und die Detektions-Minima zumindest teilweise überlappen.

Fig. 1

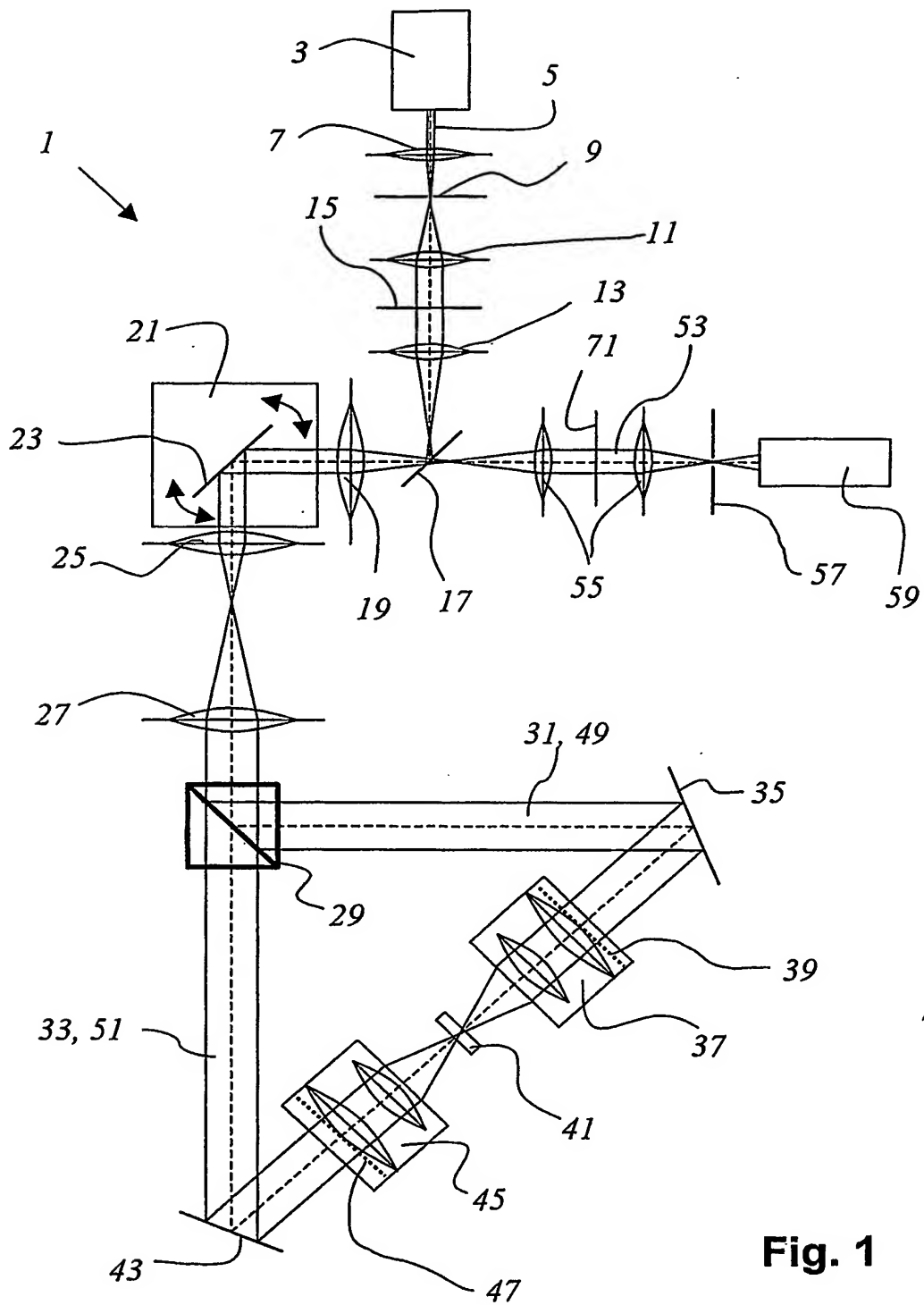


Fig. 1

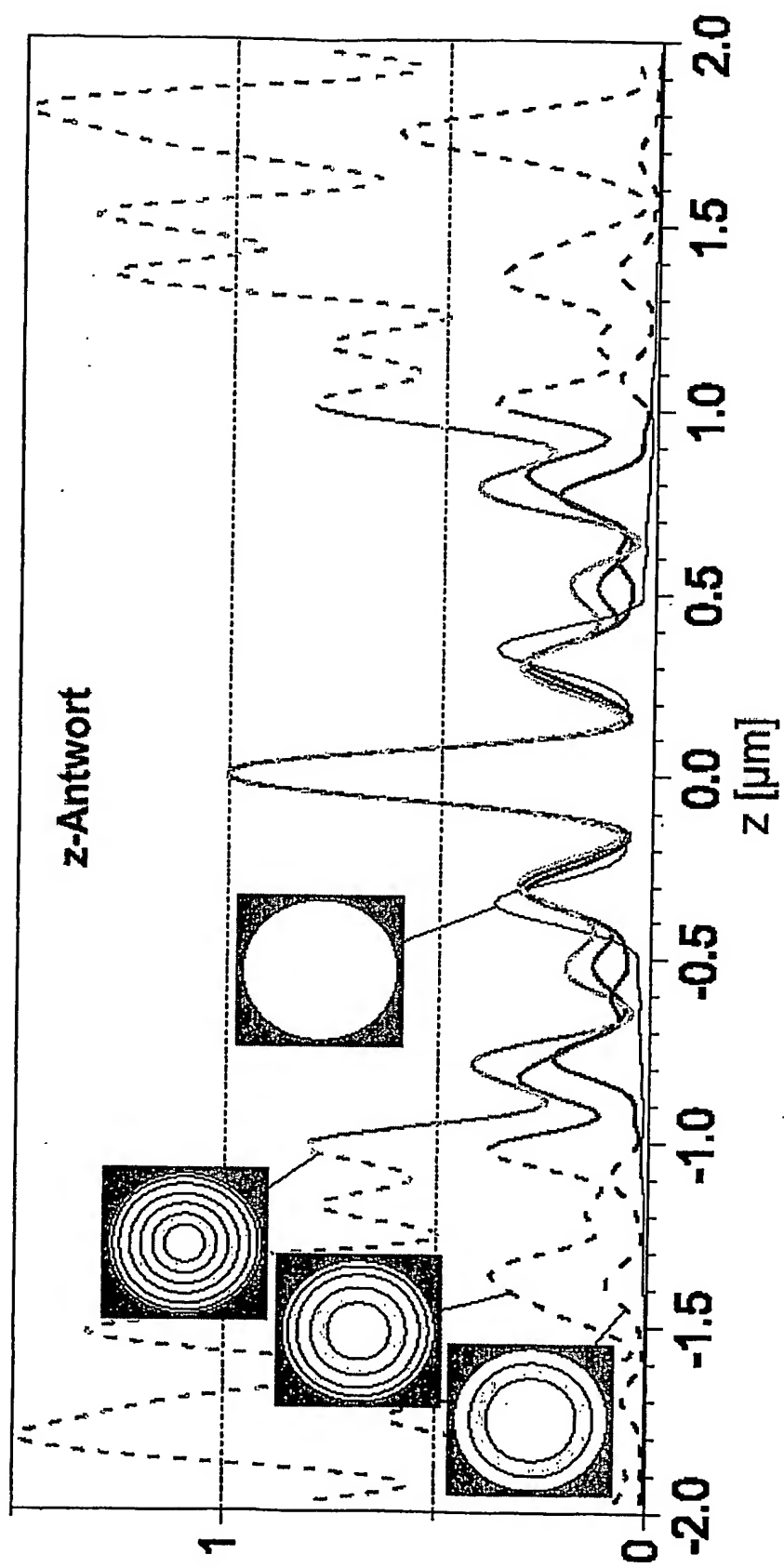


Fig. 2

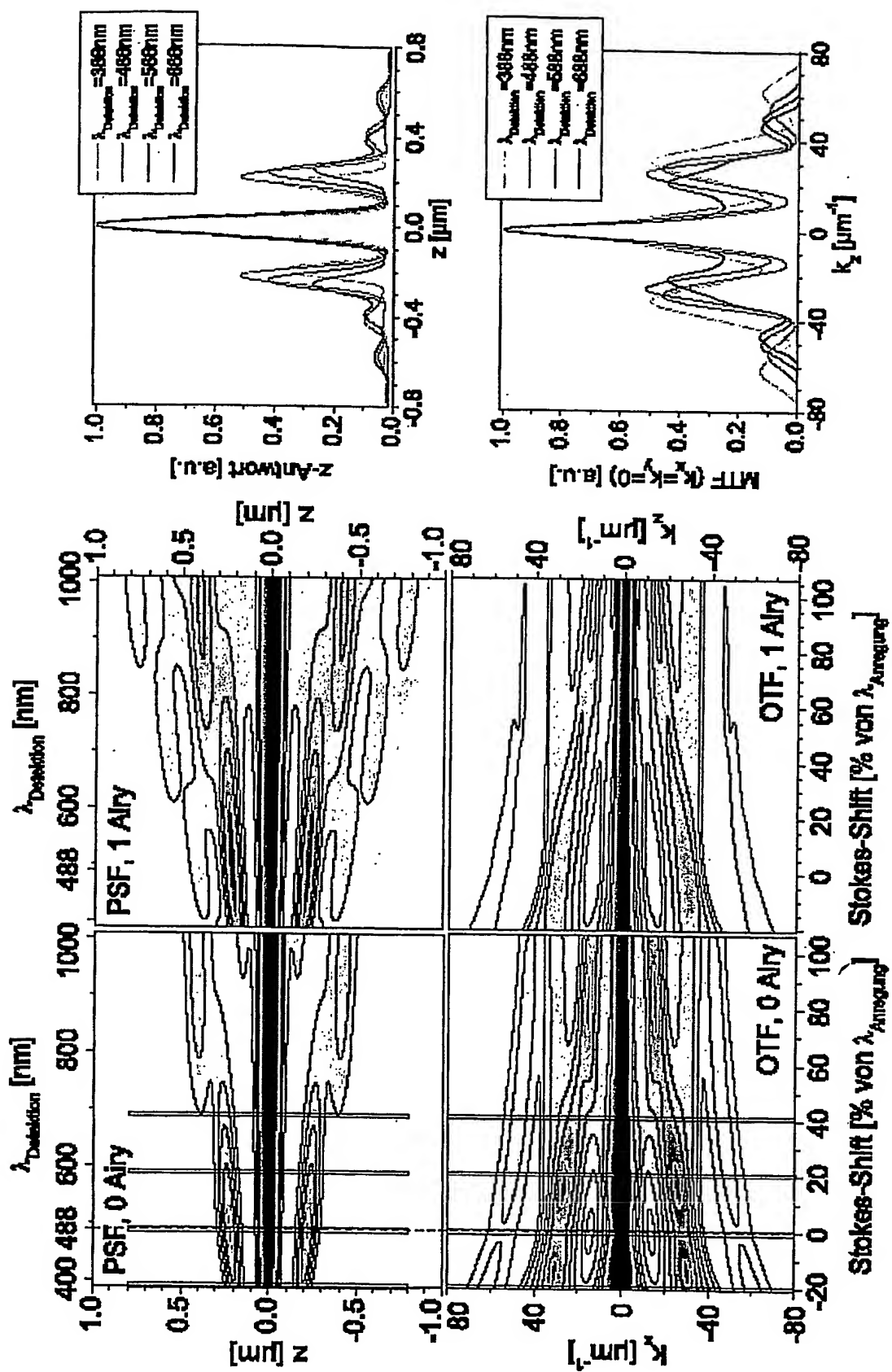


Fig. 3

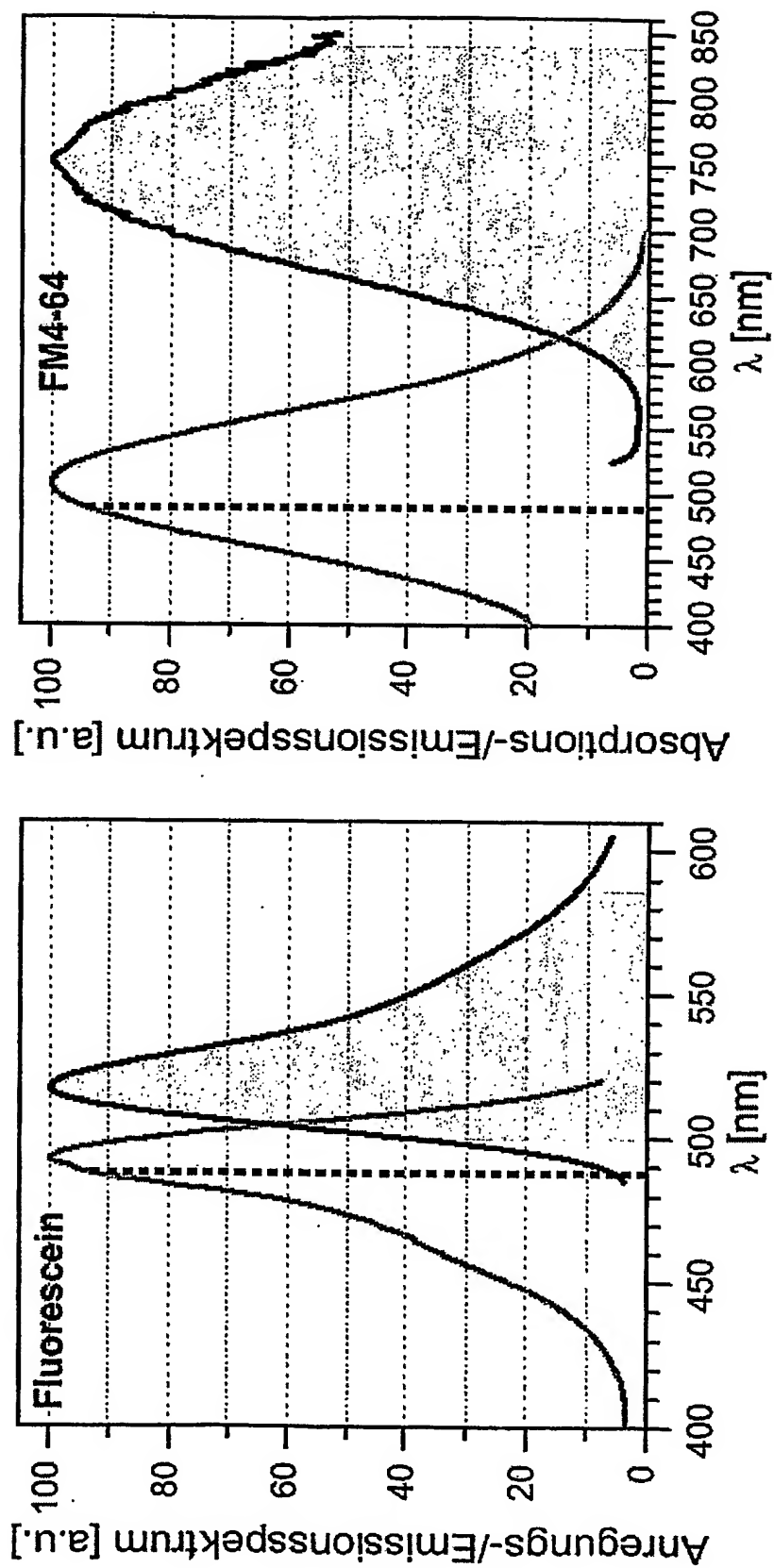


Fig. 4

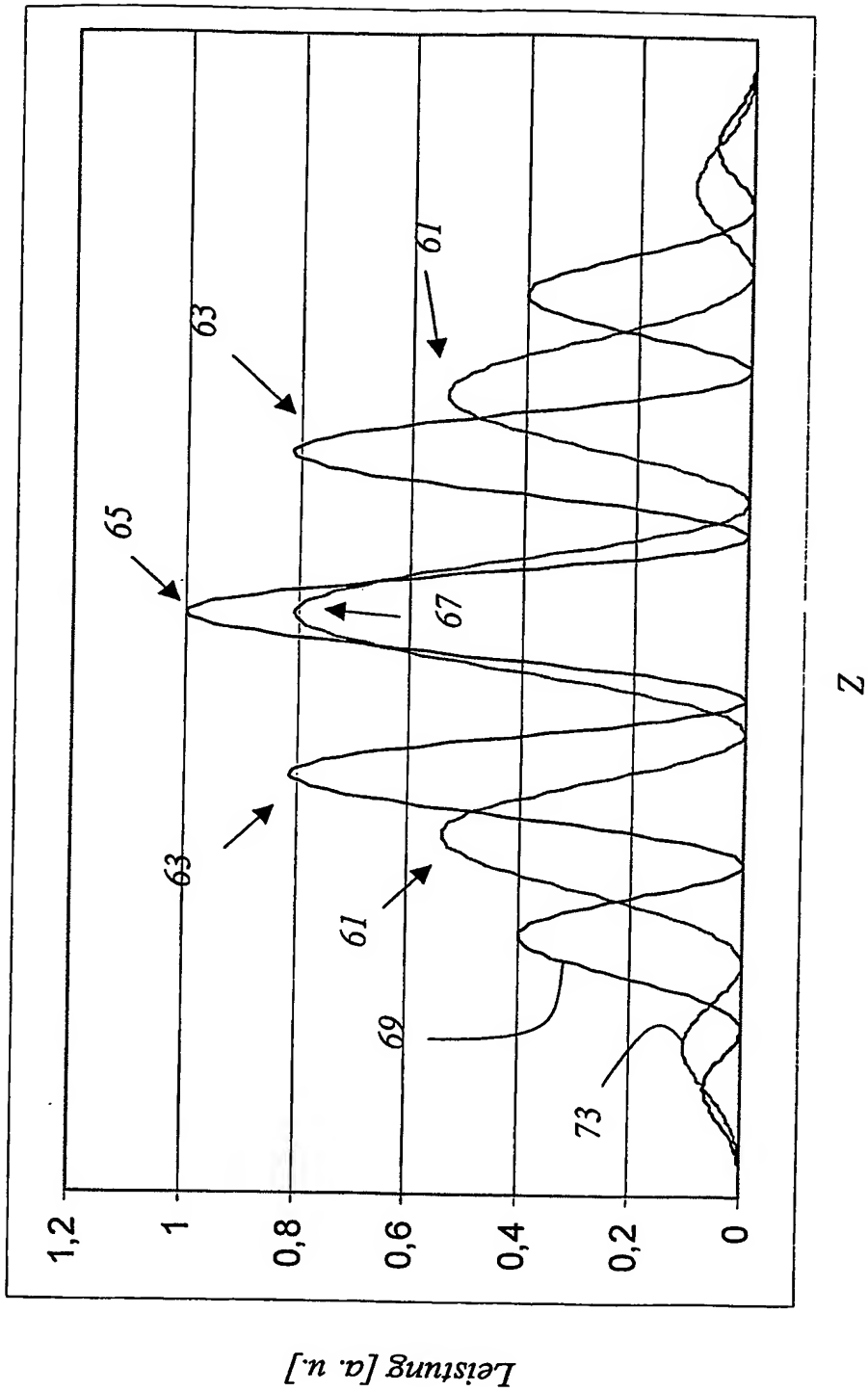


Fig. 5

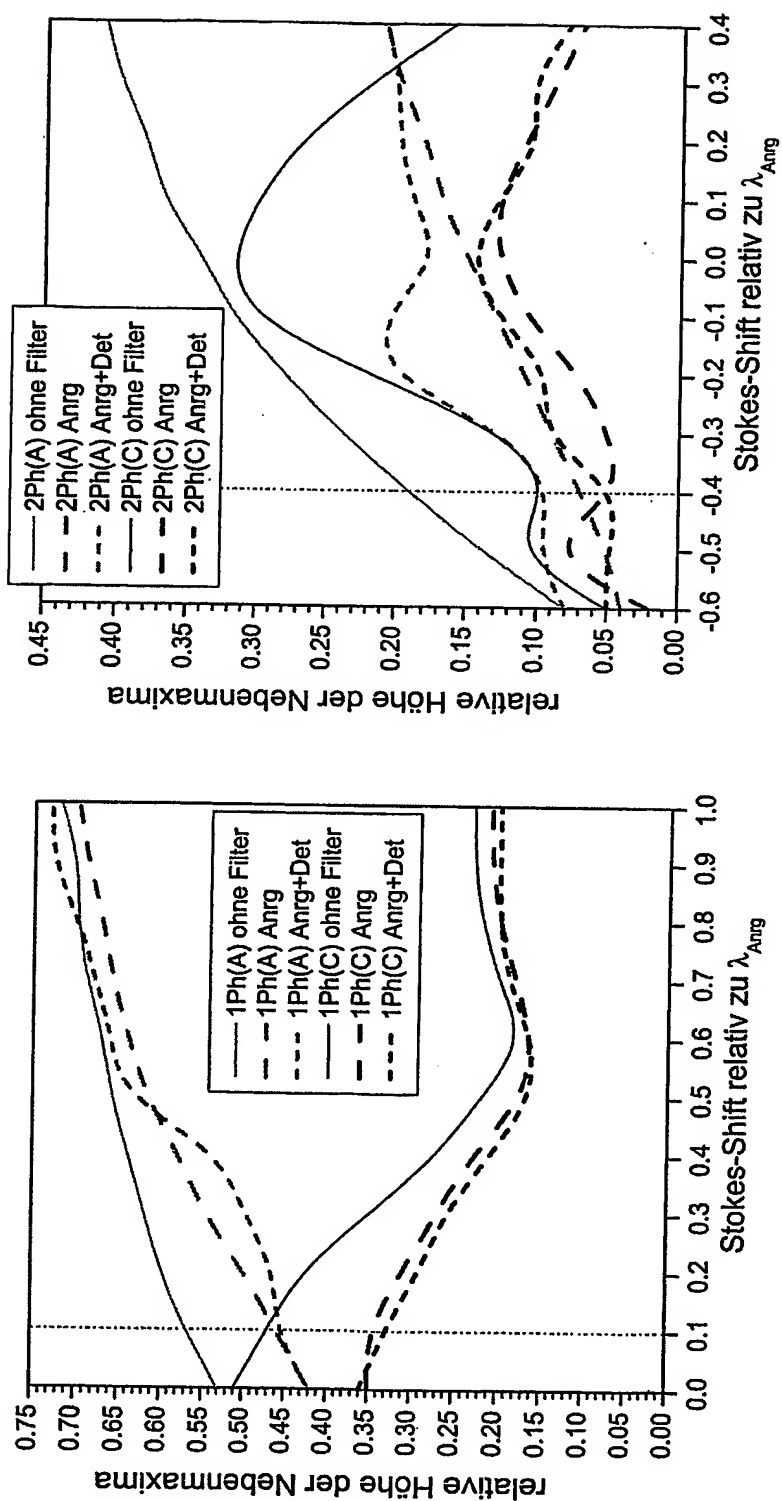


Fig. 6

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**